第4卷第2期 动物学研究 Vol. 4, No. 2
1983年5月 ZOOLOGICAL RESEARCH May., 1983

小鼠淋巴结及胸腺T、B淋巴细胞的鉴别

顾远锡 崔玉芳 徐海超

(军事医学科学院放射医学研究所)

摘要

本文用细胞化学ACP偶氮染色法和5'N"Gomori"染色法鉴别小鼠淋巴结及胸腺T、B淋巴细胞。测定小鼠上述淋巴组织细胞悬液样品中ACP及5'N活力所得的结果：淋巴结的ACP阳性细胞为67%左右，5'N阳性细胞为31%左右，胸腺的ACP阳性细胞为97%，5'N阳性细胞为10%。上述结果是相互符合的，也与目前已报导的小鼠及人的淋巴结和胸腺T、B淋巴细胞百分数基本符合。

文中就ACP偶氮染色法与非特异性酯酶染色法进行了比较，证明在小鼠上述淋巴组织细胞悬液中ACP阳性淋巴细胞基本上代表T淋巴细胞。

还就5'N "Gomori" 法染色过程中，基质液中铅离子浓度对5'N活力的影响，ACP活力抑制剂的使用和机理以及所得出的小鼠淋巴结及胸腺中T、B淋巴细胞百分数的可靠性进行了初步讨论。

在深入研究机体细胞免疫和体液免疫以及二者的相互关系所进行免疫功能的测定方面，应用免疫学方法的报导较多，而有关细胞化学的应用则甚少，如非特异性酯酶染色法鉴别T淋巴细胞的资料（Mueller, 1975; 1976; Ranki, 1976），以及鉴别B淋巴细胞的零星记载。Müller等（1974）在人的脾（白髓）切片细胞中曾发现5'核苷酸酶（5'N）反应与EAC玫瑰花试验花瓣形成的阳性关系较好。此外在人的淋巴结切片观察中也证实了在EAC阳性区只出现5'N阳性反应（Müller, 1974）Uusitalo等（1977）曾报导小鼠纯化的胸腺悬液中淋巴细胞为5'N阴性反应。goknoon等（1977）也观察到原发性血丙种球蛋白过低症患者5'N活力较正常人低得多。但也存在着与上述不同的看法（Quagliata, 1974; Uusitalo, 1977）。据此作者认为在不同淋巴组织中，检测5'N活力可能是鉴别B淋巴细胞的有效途径。鉴于淋巴细胞的细胞化学特征的应用较目前常用的免疫学方法优越，如在免疫学方法活操作过程中E-玫瑰花试验可能导致淋巴细胞内酶分布的改变及酶活力的下降(Bevan, 1980)，本文试用酸性磷酸酯酶（ACP）及5'N染色法鉴别小鼠淋巴结胸腺中的T、B淋巴细胞。

本文经刘雪桐教授审阅，朱启付教授给予有益的帮助与支持，特此志谢
本文1982年1月23日收到，1983年1月14日收到修改稿。

材料和方法

选用本院饲养的健康Laca纯系50±1日龄雄性小鼠。断头处死后取出肠系膜淋巴结或胸腺置于冷的（冰浴）0.9%生理盐水中，用眼科剪刀迅速剪碎，将细胞悬液滴于载玻片上。

ACP活力测定

染色方法：原理采用Goldberg等（1962）报导的资料

试剂和操作步骤详见前文。（顾远锡，1980）

ACP阳性细胞的确定

根据淋巴细胞染色后胞浆出现1—4个斑点型反应产物的淋巴细胞定为ACP阳性细胞（图版工图1，2及3）

5′N 活力测定

染色方法：原理采用Uusitalo等（1977）报导的资料。

试剂

固定液—20%甲醛50%丙酮混合液。

5′-腺苷磷酸124毫克／100毫升。

0.2M三羟甲基氨基甲烷—顺丁烯二酸缓冲液pH7.8。

0.1M硫酸镁。

1.8mM硝酸铅。

2%硫化铵。

步骤

涂片制备：取小鼠淋巴结或胸腺悬液作成厚涂片，空气干燥。

固定：新鲜干燥涂片在0°C固定液中固定一分钟。

基质液保温：溶解5毫克5′-腺苷磷酸于4毫升蒸馏水中，充份搅拌使其全溶，加入三羟甲基氨基甲烷—顺丁烯二酸缓冲液（pH7.8）4：4毫升，0.1M硫酸镁溶液1毫升及蔗糖0.5克，即时搅拌促其溶解，最后滴加1.8mM硝酸铅0.6毫升，并不断搅拌，最后溶液透明，pH为7左右。除上述试剂外再加入L(+)酒石酸75毫克，使其最后浓度为0.05M。用5N氢氧化钠调节pH至7。最后将上述基质液倒入装有涂片的塑料合中，37°C保温1小时，取出涂片用蒸馏水冲洗，干燥。

干燥涂片置于新配制的2%硫化铵溶液中4分钟，涂片用自来水彻底冲洗、干燥。

复染：2%甲绿一分钟，用蒸馏水漂洗1—2次。

染色结果：淋巴细胞浆膜（plasma Membrane）出现带状分布的黑褐色粉尘状颗粒。

5′N阳性细胞的确定

根据淋巴细胞染色后浆膜出现呈带状分布的黑褐色粉尘状颗粒的淋巴细胞定为5′N阳性细胞（图版Ⅰ 图4，5，6）。

结　　果

小鼠淋巴结ACP及5′N活力的检测

按上述已建立的ACP及5′N染色法，检测小鼠淋巴结悬液涂片上的ACP及5′N活力，5次实验结果见表1。

表 1　　小鼠淋巴结ACP及5′N阳性细胞所占的百分数

实验次数	ACP阳性细胞百分数（均值±标准差）	5′N阳性细胞百分数（均值±标准差）
5	67.47±5.71*	31.47±7.29*

* 细胞总新均为3,600

从表1结果可见小鼠淋巴结淋巴细胞中ACP阳性细胞约为67%左右，而5′N阳性细胞约为31%左右。

小鼠胸腺ACP及5′N活力的检测

在得出淋巴结淋巴细胞中ACP及5′N阳性细胞结果的基础上，按照相同的方法又观察胸腺细胞悬液涂片上ACP及5′N活力，5次实验见表2。

表 2　　小鼠胸腺ACP及5′N阳性细胞所占的百分数

实验次数	ACP阳性细胞百分数（均值±标准差）	5′N阳性细胞百分数（均值±标准差）
5	97.76±2.53*	10.34±3.21**

*细胞总数为4,600　　**细胞总数为2,900

表2结果指出小鼠胸腺淋巴细胞中ACP阳性细胞约为97%左右，而5′N阳性细胞约为10%左右。

讨　　论

非特异性酯酶是一种溶酶体水解酶。Ranki（1976）将酯酶活力测定用于人淋巴细胞染色，结果证明T淋巴细胞呈阳性反应，并认为酯酶的反应产物可作为T淋巴细胞的标志。Horwitz等（1977）和Sher（1976）已证明非特异性酯酶阳性淋巴细胞与E-玫瑰花阳性淋巴细胞百分数之间存在平行关系，并认为非特异性酯酶染色可以代替E-玫瑰花试验检测T淋巴细胞。Ranki（1978）也观察到人外周血淋巴细胞非特异性酯酶阳性率与E-玫瑰花形成率相平行。尽管在用非特异性酯酶检测T淋巴细胞问题上还存在一些不同的看法，目前非特异性酯酶染色法已被普遍应用作为T淋巴细胞的检测方法。

作者从1981年1月开始用偶氮ACP染色法检测小鼠淋巴结及胸腺中的T淋巴细胞。多次实验结果说明ACP染色法（与非特异性酯酶染色法相比）同样可以用来检测T淋巴细胞，其根据如下：

（1）酶反应产物类型

Higgy（1977）及Obrist等（1978）认为形成明亮棕红色斑点型反应产物者为成熟的T淋巴细胞，而对形成散在颗粒型反应产物者则意见不一，有的认为是幼稚的T淋巴细胞，有的认为是B淋巴细胞。

Bevan等（1980）用偶氮ACP染色法已证明人外周血淋巴细胞，凡含有1—4个斑点型反应产物者多属T淋巴细胞。

作者（1981）在多次实验中发现小鼠淋巴结及胸腺细胞悬液中绝大多数ACP阳性细胞含有1—4斑点型反应产物。从中得出的ACP阳性淋巴细胞在淋巴结中为63%左右，胸腺中为97%左右。上述结果与已报导的淋巴结及胸腺中T淋巴细胞百分数是相符的。

（2）正常人ACP阳性细胞数与非特异性酯酶阳性细胞数的关系

Bevan等（1980）曾报导ACP阳性淋巴细胞的款式与公认的T淋巴细胞的非特异性酯酶阳性淋巴细胞的款式十分相似。根据6例正常人得出的结果，说明T淋巴细胞的比例相近，属ACP阳性细胞款式者为56±9%，属非特异性酯酶阳性细胞款式者为62±7%。

在B淋巴细胞样品中属ACP阳性细胞款式者为4±6%，属非特异性酯酶阳性细胞款式者为6±8%。

（3）E-玫瑰花阳性淋巴细胞中ACP阳性细胞数与非特异性酯酶阳性细胞数的关系。

根据Bevan等（1980）12次实验数据得出的均值，在E-玫瑰花阳性淋巴细胞用非特异性酯酶染色后得到的T淋巴细胞为63.9%左右，而偶氮法的ACP染色后得出的T淋巴细胞为57.5%左右。

E-玫瑰花阴性淋巴细胞用非特异性酯酶染色后得出的T淋巴细胞为5.3%左右，而偶氮法的ACP染色后得出的T淋巴细胞为2.8%左右。

（4）ACP阳性淋巴细胞及非特异性酯酶阳性淋巴细胞的超微结构

Bevan等（1980）有关双染色（double staining）法结果表明ACP偶氮法与非特异性酯酶染色的部位是相同的。ACP的超微结构结果指出它们染色的部位就在淋巴细胞溶酶体上。

以上有关小鼠淋巴结及胸腺细胞悬液的实验结果足以证明ACP偶氮染色法可以鉴别小鼠淋巴组织及人外周血中的T淋巴细胞，因此，可以认为在T淋巴细胞鉴别的应用上ACP染色法与非特异性酯酶染色法具有同样的价值。

用"Gomori"染色反应显示5′N活力过程中，有二个重要的影响因素必须予以考虑，其中之一即基质保温液中的铅离子浓度。Klaushofer等（1979）在肝切片研究中曾指出，基质保温液中较高的铅离子浓度可抑制5′N活力，如3.6mM硝酸铅即可抑制肝切片5′N活力达38%。浓度过低时（0.3mM）酶形成的反应产物就明显地减弱。本实验开始时曾使用3.6mM硝酸铅进行5′N活力测定，除注意到较高的铅离子浓度可能抑制5′N活力作用外，更主要的是在向基质保温液滴加硝酸铅时，即使在不断搅伴的情况下，出现极为明显的白色沉淀。改用1.8mM硝酸铅后基质保温液基本透明，黑褐色的反应产物也较为明显。0.9mM铅离子浓度则使酶的反应产物有一定程度的减弱。因此，在淋巴组织细胞悬液条件下使用1.8mM铅离子浓度是较为适当的。

由于5′N及ACP皆存在于淋巴细胞内，在应用“Gomori”染色反应显示5′N时，在一定的pH条件下ACP也能部分水解5′N的作用基质—5′-腺苷磷酸。因此，必须向基质液中加入ACP抑制剂。目前使用的ACP抑制剂较多如0.01M酒石酸钾钠（Silber, 1975; Quagliata, 1974）、氟化物（0.01M）、钼酸盐（0.01M）及L(+)酒石酸（0.05M），但各有其优缺点。加入0.01M钼酸铵或钼酸钠后基质液产生大量白色乳糜状沉淀，一定程度上影响涂片中淋巴细胞的清晰度，而酒石酸钾钠抑制ACP活力的作用并不十分完全。本实验已证明L(+)酒石酸可完全抑制ACP活力。向ACP偶氮法的基质液（10毫升）加入L(+)酒石酸75毫克（0.05M），不仅可完全抑制淋巴细胞ACP活力，使胞浆不出现粉红色反应产物，而且在加入L(+)酒石酸基质液不产生白色沉淀，溶液基本上清晰透明。L(+)酒石酸之所以能抑制小鼠淋巴结及胸腺中淋巴细胞ACP活力主要是由于选择性地抑制了ACP同功酶（同功酶5除外）。（Li et al., 1970）

根据Hudson等（1980）的报导及其他有关的资料皆提供了小鼠和人淋巴结及胸腺T、B淋巴细胞百分数的近似值。可以引用这些数据估价本实验用ACP及5′N染色法得出的小鼠淋巴结及胸腺中T、B淋巴细胞百分数。Bevan等（1980）报导的资料已指出人外周血E-玫瑰花阳性淋巴细胞中ACP阳性淋巴细胞数与非特异性酯酶阳性淋巴细胞数基本上是相同的。本文在有关ACP染色法鉴别小鼠淋巴结及胸腺T淋巴细胞部分中，作者也从几个方面证明ACP阳性细胞与非特异酯酶阳性细胞一样可以鉴别T淋巴细胞。因此，可以认为用偶氮法测定的小鼠淋巴结及胸腺ACP阳性淋巴细胞基本上代表T淋巴细胞，基于以上依据，本实验测定小鼠淋巴结及胸腺淋巴细胞的ACP及5′N活力，用以检验得出的ACP及5′N阳性细胞百分数是否与国际上已报导的淋巴组织中T、B淋巴细胞百分数相符。淋巴结及胸腺细胞悬液样品中ACP及5′N活力测定的5次实验结果表明，实验数据是互相符合的。小鼠淋巴结及胸腺淋巴细胞中ACP及5′N阳性细胞在98—107%范围内波动。上述结果与已报导的淋巴结及胸腺T、B淋巴细胞的百分数也是相符的。

参考文献

顾远锡 1980 《放射医学与防护》 3:29.

Bevan, A. et al. 1980 *Scand. J. Immunol.* 11:223.

Goldberg, A. F. et al. 1972 *Nature* 195:297.

Higgy, K. E. et al. 1977 *Scand. J. Haematol.* 18:437.

Horwitz, D. A. et al. 1977 *Clin. Exp. Immunol.* 30:389.

Hudson, L. et al. 1980 *Practical Immunology* P. 25.

Johnson, S. M. et al. 1977 *Lancet* 1 (*No.* 8001), 168.

Klaushofer, K. et al. 1979 *J. Histochem. & Cytochem.* 27:1582.

Li, C. Y. et al. 1970 *J. Histochem. & Cytochem.* 18:901.

Muller, J. 1975 Eur *J. Immunol.* 5:270.

Muller, J. 1976 *Scand. J. Immunol.* 5:449.

Muller, J. K. et al. 1974 *Cell Tissue Res.* 154:167.

Muller, H. K. et al. 1974 *Virchows Arch. B Cell Path.* 16:371.

Obrist, R. 1978 *Experientia* 34:660.

Quagliata, F. et al. 1974 *Cancer Res.* 34:3197.
Ranki, A. 1976 *Scand, J. Immunol. Immunopath.* 10:47.
Sher, R. 1976 *S. Afr. Med.* 50:1009.
Silber, R. et al. 1975 *J. Clin. Invest.* 56:1324..
Uusitalo, R. J. et al. 1977 *J. Histochem. & Cytochem.* 25:87.
Uusitalo, R. J. et al. 1977 *J. Histochem. & Cytochem.* 25:97.
Yam, L. T. et al. 1971 *New Engl. Medicine* 284(7):357.

IDENTIFICATION OF MOUSE LYMPH NODE AND THYMUS T, B LYMPHOCYTE

Gu Yuan Xi Tsui Yu Fang Xu Hai Chao

(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Science)

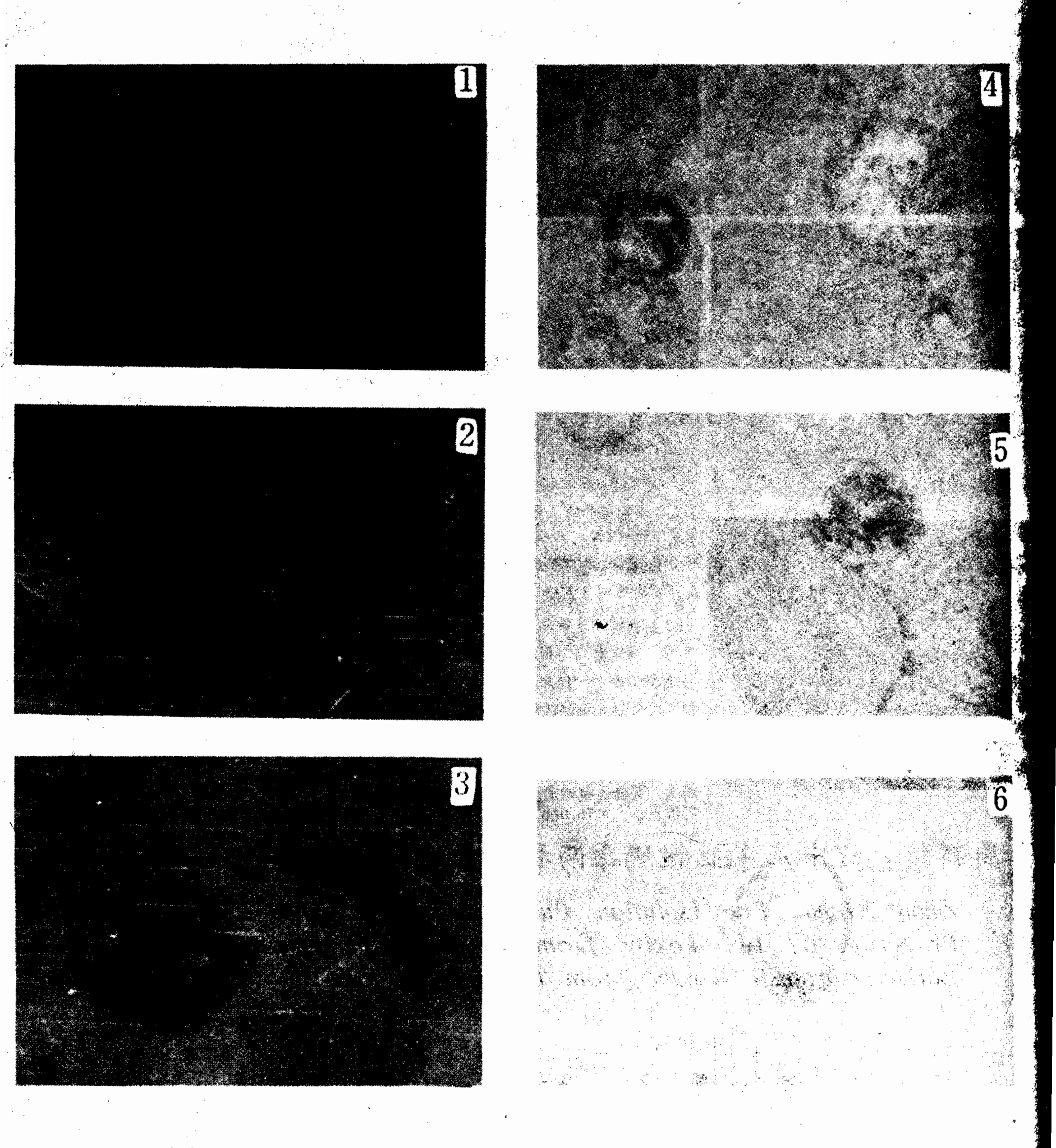
The azo dye method for acid phosphatase and "Gomori" method for 5' Nucleotidase were used to identify the T and B lymphocytes of mouse lymph node and thymus cytochemically. By employing these methods, the estimation of ACP and 5'N activities of parallel samples from the lymph node and thymus cell suspensions were carried out in order to verify the ACP and 5'N positive lymphocyte percentages obtained previously. The ACP and 5'N positive lymphocytes thus estimated for lymph node were found to be 67% and 31%, whereas those for the thymus were around 97% and 10% respectively. Above mentioned results were not only well fitted with each other but also in good accordance with those already published.

In addition, from the following poins=the enzyme reaction products, the relationship between T-cell acid phosphatase pattern and T-cell esterase pattern in 6 normal individuals, the number of T-cell acid phosphatase and T-cell esterase pattern in resette preparations and the ultrastructural cytochemistry, the azo dye method for acid phosphatase was compared with the nonspecific esterase staining method for the T lymphocyte identification. It was proved that these two methods were of the same value in the T lymphocyte identification of mouse lymph node and thymus cell suspensions.

Furthermore, the effect of different lead concentrations in the incubating medium on 5'N activity, the use of ACP inhibitor and its possible mechanism and the reliability of T, B lymphocyte percentages of mouse lymph node and thymus were also briefly discussed.

顾远锡等：小鼠淋巴结及胸腺 *T*、*B* 淋巴细胞的鉴别

Gu Yuanxi et al. Identification of Mouse Lymph Node and Thymus T. B Lymphocyte



小鼠淋巴结及胸腺 *ACP* 阳性淋巴细胞

1.酸性磷酸酯酶活力"1"分型 淋巴细胞胞浆出现1个粉红色颗粒

2.酸性磷酸酯酶活力"2"分型 淋巴细胞胞浆出现2个粉红色颗粒

3.酸性磷酸酯酶活力"3"分型 淋巴细胞胞浆出现3个粉红色颗粒

小鼠淋巴结及胸腺 5′*N* 阳性淋巴细胞

4.左下方5′核苷酸酶弱阳性淋巴细胞，胞膜出现呈带状分布的黑褐色粉尘状颗粒右上方5′核苷酸酶阴性淋巴细胞

5.左下方5′核苷酸酶弱阳性淋巴细胞

右上方5′核苷酸酶阳性淋巴细胞

6.5′核苷酸酶阳性淋巴细胞